

Artículo de investigación

DETECCION DE *Brucella* sp. POR PCR EN SANGRE DE BOVINOS Polimerasa Chain Reaction (PCR) detection of *Brucella* sp. in bovine blood.

Pacheco N^{1*}, Mosquera O²

- 1.*Laboratorio Microbiología Veterinaria, Laboratorio de Virología y Biología Molecular. Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". nancypacheco@ucla.edu.ve.
- 2.Unidad de Epidemiología Veterinaria del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".

Resumen

El objetivo de este estudio se enmarca en la estandarización de la PCR de secuencias genómicas parciales específicas del género *Brucella*: genes 16S rRNA y Omp2, en sangre de bovinos seropositivos a las pruebas oficiales, como una técnica alternativa para la confirmación de los resultados obtenidos por las pruebas serológicas. Para este estudio fue seleccionado un rebaño de 31 bovinos identificado como seropositivo a brucelosis, de acuerdo con las pruebas serológicas oficiales. Fue utilizado el programa estadístico Epidat 3.1 para calcular la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas incluidas, con respecto a la prueba Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siendo realizadas las pruebas, Rosa de Bengala (RB), Seroaglutinación Lenta en Tubo (SLT) y 2Mercaptoetanol (2ME), los resultados logrados en la sensibilidad fue de 100% para SLT y la especificidad de 88% la obtuvo la prueba RB, mientras la concordancia de acuerdo al índice Kappa, fue discreta, para la prueba RB en relación a PCR. En cuanto a la amplificación por PCR de los genes incluidos en el estudio fue exitosa en el 16 % (5/31) de las muestras analizadas, considerado los animales verdaderos positivos a la enfermedad. Se concluye que la PCR es una herramienta de diagnóstico muy importante para avanzar en el control de la brucelosis bovina en el país, evitando la eliminación de animales valiosos o dejando animales falsos negativos que continúen diseminando la enfermedad en el rebaño bovino nacional.

Palabras Clave: Bovino, Diagnóstico, PCR, *Brucella abortus*, Sangre.

Abstract

The main objective of this research was to standardize specific and partial genomic sequences of *Brucella* genus: genes 16S rRNA, and omp from blood of seropositive cattle, in order to confirm results reached by serologic tests. A herd of 31 bovines was selected and identified as seropositive to brucellosis by official serological tests. The program Epidat 3.1 was chosen to determine sensitivity and specificity of those serological tests, against the Polymarase Chain Reaction (PCR). Bengala Rose (BR), slow seroagglutination in tube (SST), and 2 mercaptoethanol (2ME) tests were the official serological assays used. 2ME showed a sensitivity of 100%, and a specificity of 88% was found for the BR test, whereas the correlation (by Kappa Index) was discrete for the test RB when related to the PCR test. With regard to PCR amplification of selected genes was successful in a 16% (5 out of 31) of blood samples tested collected from true positives to brucellosis. In conclusion, PCR is a very important diagnostic tool to advance in the bovine brucellosis control in Venezuela, since it avoids the culling of valuable animals, and it discovers false negatives, which would stay in farms as a source of infection for other herds.

Key Words: bovine, diagnosis, PCR, *Brucella abortus*, blood.

Recibido: 19-02-2016.

Aceptado: 25-04-2016

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica que genera un marcado impacto en la salud pública y salud animal de importancia para la ganadería; teniendo además relevancia en el ámbito económico nacional [1, 2, 3]. Entre las especies de *Brucella* descritas en Venezuela se encuentran la *B. abortus suis*, *B. canis*; siendo la *B. abortus* la especie de mayor trascendencia epidemiológica, por causar brucelosis en las diversas especies animales, especialmente en los rumiantes [2, 3]. Su transmisión al humano se produce por la ingesta de productos lácteos contaminados, no sometidos a ningún proceso de pasteurización o de higienización [4].

En Venezuela como en otros países donde la brucelosis es endémica, la enfermedad se caracteriza en los rebaños por causar esterilidad en machos y abortos en hembras preñadas, lo que ocasiona graves pérdidas económicas [3, 5]. La infección por esta bacteria en humanos conduce a una enfermedad con tendencia a la cronicidad, con fiebre y malestar recurrente que puede cursar con cuadros de artritis, meningitis, entre otras patologías no asociadas comúnmente a esta infección, deteriorando progresivamente la calidad de vida del paciente, en los cuales la etapa aguda de la infección pueden muchos de los casos pasar desapercibidas [4, 6].

Las patologías observadas en humanos y animales con infección crónica por *B. abortus*, son desencadenadas principalmente por mecanismos de la respuesta inmunitaria frente a los principales antígenos de superficie de la bacteria, como el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) y a las proteínas de membrana externa (Omp) [7]. El lipopolisacárido (LPS) de la *Brucella abortus* constituye el componente inmunodominante de las cepas lisas infecciosas, provocando en las especies susceptibles que casi la totalidad de los anticuerpos específicos a la infección estén dirigidos contra este antígeno [7, 8].

La brucelosis se caracteriza por presentar un gran repertorio de métodos de diagnóstico y aun se siguen investigando activamente nuevos procedimientos tratando de buscar el

más acertado, es decir que sea de fácil ejecución, que identifique a los animales positivos y que permita diferenciar infectados, de vacunados [1, 9]. La selección y aplicación de los métodos de diagnóstico en programas de control y erradicación dependerán de la especie animal involucrada, población bajo vigilancia, tasa de prevalencia y del programa de vacunación implementado. Además se han desarrollado varias pruebas confirmatorias con el propósito de eliminar o disminuir reacciones heteroespecíficas, detectar la presencia de anticuerpos incompletos, diagnosticar correctamente el mayor número de casos crónicos y determinar o diferenciar títulos serológicos residuales de vacunaciones o por resultados de infección [9].

La aplicación de métodos de diagnóstico directo como el cultivo bacteriológico, reconocido como “pruebas de oro” para el diagnóstico de las infecciones bacterianas, limitan su aplicación en esta infección, dada su alta exigencia de recursos de laboratorio, tiempo y personal especializado; lo cual la colocan en desventaja frente otros métodos [4]. El desarrollo de técnicas de biología molecular con un alto grado de sensibilidad y especificidad (PCR, RFLP) para detectar y amplificar secuencias específicas del genoma bacteriano (DNA genómico, DNA ribosomal, ADN plasmidial, RNAr, RNAm y RNAt) promueven el interés de su aplicación en la identificación de microorganismos patógenos y en especial los pertenecientes al género *Brucella*, alcanzando incluso la diferenciación del resto de sus especies [10]; tal precisión, hace de estas técnicas, excelentes alternativas para el diagnóstico de microorganismos infecciosos de difícil cultivo y alto riesgo biológico que afecten a poblaciones animales [4, 11] y a humanos [12, 13].

En la década pasada grandes aportes fueron obtenidos en el estudio molecular de varias de las especies de *Brucella* y en especial la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con fines diagnósticos [4, 10]. Algunas de las secuencias genómicas analizadas y seleccionadas como posibles blancos diagnósticos incluyen secuencias 16S del RNAr, 23S RNAr, secuencias de

inserción o espaciadoras (Ej: IS711, IS6501) [2] y proteínas de superficie inmunodominantes como el locus omp2, [12] todas estas secuencias con alta especificidad para la identificación de género e incluso en algunos casos las diferentes especies [14].

En evaluaciones de sensibilidad y especificidad realizadas a la prueba Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando 30 muestras procedentes de bovinos sanos inoculados con una cepa de *Brucella abortus* y 30 muestras de bovinos inoculados con otras bacterias, han encontrado una sensibilidad de 100% y una especificidad de 100%, por lo que esta técnica puede ser usada como prueba de oro en los estudios seroepidemiológicos [15].

En estudios realizados con la PCR como prueba de oro en el diagnóstico de *Brucella abortus*, la sensibilidad encontrada de la prueba Rosa de Bengala (RB), fue de 44,68 % y la especificidad de 95,5%, con respecto a la prueba Seroaglutinación Lenta en Tubo (SLT), la sensibilidad fue de 51,61% y la especificidad de 88,52, mientras que con 2Mercapto etanol (2ME) la sensibilidad y especificidad fueron de 53,57 y 87,50% respectivamente. Concluyendo que la prueba PCR constituye una herramienta importante para el diagnóstico preciso de la enfermedad [16].

Un protocolo de diagnóstico de *Brucella abortus* realizado en una finca bufalina (*Bubalus bubalis*) con una población de 80 búfalos, fueron sometidos a las pruebas de diagnóstico RB, SLT y 2ME y sus resultados fueron confirmados con la prueba PCR. La sensibilidad obtenida fue de 100% para las técnicas RB, SLT y 2ME, mientras la especificidad fue de 48% para la prueba RB y 97% para las pruebas SLT y 2ME. Con respecto al índice Kappa fue de 0,11 para la técnica RB y 0,80 para SLT y 2ME, para una concordancia insignificante y perfecta respectivamente [17].

MATERIALES Y MÉTODOS

Fue muestreado un total de 31 bovinos adultos pertenecientes a un predio ubicado en la Parroquia Buría del estado Lara,

clasificado como rebaño positivo a brucelosis de acuerdo con los lineamientos establecidos en el Programa nacional de prevención, control y erradicación de brucelosis coordinado por el Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral del estado Lara (INSAI) durante el año 2009. Se tomaron de cada bovino 10 ml de sangre de la yugular, las cuales fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología Veterinaria.

Pruebas serológicas

Las muestras de suero sanguíneos fueron remitidas al Laboratorio Regional de Diagnóstico Zoonosario del INSAI-MPPAT Lara ubicado en la ciudad de Carora, para la realización de las pruebas serológicas oficiales para el diagnóstico de brucelosis bovinas siguiendo las normas descritas por la OMS/OPS [11,14]. Las pruebas realizadas fueron Rosa de Bengala (RB), Seroaglutinación Lenta en Tubo (SLT) y Prueba 2 Mercapto-Etanol (2ME).

Estas técnicas de diagnóstico no son 100% exactas, para identificar los animales infectados o no infectados, en vista de lo cual se calculó la sensibilidad, la especificidad y el Índice Kappa que mide la concordancia entre las técnicas incluidas, mediante el programa estadístico Epidad 3.1. La sensibilidad fue demostrada por porcentaje de animales sanos que dan positivos a las pruebas y especificidad como el porcentaje de animales sanos que dan negativos a las pruebas, mientras que el índice Kappa tiene un valor entre 0 y 1, siendo 0 de ninguna concordancia, valores entre 0 y 0,20 es concordancia insignificante y entre 0,21 y 0,40 la concordancia es discreta, hasta 0,80 a 1 que significa concordancia perfecta [18].

Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico fue realizada a partir de las muestras de sangre completa y suspensiones de cepas vacúnales de *Brucella abortus* biovar 1 cepa 19, *B. Abortus* biovar 1 cepa RB51 seleccionados como controles positivos del estudio. Todas las extracciones de ADN se realizaron siguiendo el protocolo básico de extracción de ADN genómico para bacterias gram negativas (WIZARD genomic ADN®).

Promega) [19]. Se precipitó el ADN adicionando 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente, el ADN obtenido fue resuspendido en un volumen final de 100 µl de la solución de la rehidratación (buffer TE) y almacenados a -20°C hasta su uso. La integridad del ADN se evaluó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,5% y analizados en un transiluminador UV.

Amplificación por pcr de los genes 16S RNAr y omp2 de *Brucella sp*.

La preparación de reacciones de PCR, se realizó en el interior de una campana de flujo laminar tipo I, cada muestra fue analizada al menos dos veces para cada gen. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador Eppendorf AG hmbug modelo-22331. Las reacciones de PCR fueron preparadas con PCR Master Mix para un volumen final de la reacción de 25 µl, con una concentración final de sus componentes: 1,5 mM de MGGGM 7QQTV Cl₂, 10 mM de Tris-HCL, 50 mM de KCl y 200 µM de cada desoxidonucleósido trifosfato dNTP (CTP, GTP, ATP, TTP), 2,5 U de Taq ADN polimerasa, 2 µM de ADN de las muestras. Fue utilizado como control negativo agua y ADN de *E. coli*.

La detección por PCR de *Brucella sp* en las muestras de ADN bovinas consistió en la amplificación de genes de 16S RNAr del

género *Brucella* secuencias iniciadoras F4: 5" TCG AGC GCC CGC AAG GGG 3", R2: 5'- AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA-3 [17] y gen omp2 S5: 5'- TGG AGG TCA GAA ATG AAC- 3 y S6: 5'- GAG TGC GAA ACG AGC GC -3' [4]; las condiciones de reacción para cada gen fueron las siguientes: secuencias iniciadoras S5 y S6 del gen 16S RNAr fueron las siguientes: un primer ciclo de 95 °C por 5 min más 40 ciclos de 95 °C por 30 min, 54 °C por 90 seg, 72 °C por 90 segundos y una extensión final de 72 °C por 6 min. para el gen omp2 secuencias iniciadoras F4- R las condiciones fueron: un ciclo de 95 °C por 3 min más 35 ciclos de 95 °C por 20 min, 54 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 7 min.

Los productos amplificados se evaluaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2,0%. En cada pozo del gel se cargó un volumen de muestra de 12 µl + 5 µl del buffer de carga Blue/Orange 6X LoadingDye (G190A), para evidenciar el tamaño de los amplificados se utilizó el estándar de peso molecular 100 bp ADN Ladder bajo las siguientes condiciones de corrida: de 80-100 voltios durante 1 hora a temperatura ambiente. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 0,5 µg/ml, en Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) (0,04 M Tris, 0,001 M EDTA y 1,14% v/v de ácido acético glacial a pH 8,0) Las bandas de ADN fueron visualizadas bajo luz UV en un transiluminador de geles (Tabla I).

Tabla I . Secuencias iniciadoras (*primers*) de los genes Omp2 y 16S DNAr del género *Brucella sp*.

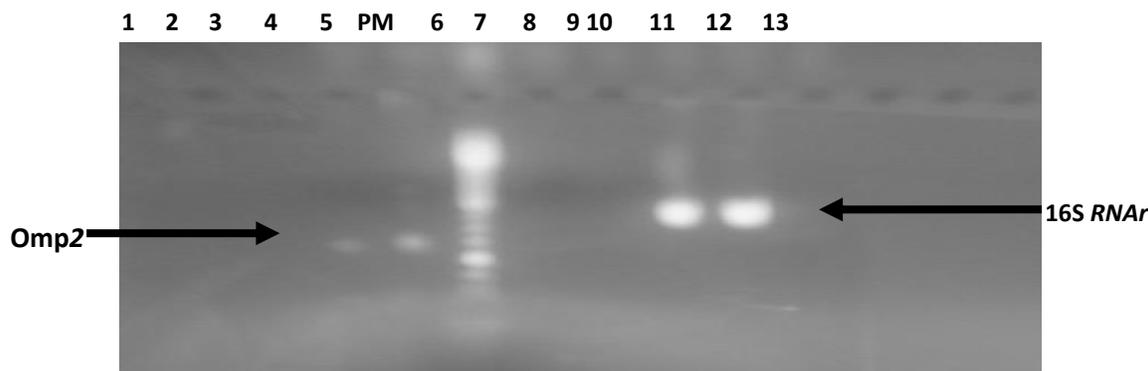
GEN / REFERENCIA	PRIMERS	SECUENCIAS	PRODUCTO AMPLIFICADO
16S Rrna [12]	F4	5" TCG AGC GCC CGC AAG GGG 3"	905 bp
	R2	5'- AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA-3'	
Omp2 [4]	S5	5'- TGG AGG TCA GAA ATG AAC- 3	282bp
	S6	5'- GAG TGC GAA ACG AGC GC -3'	

RESULTADOS

Amplificados de 282 y 905 bp fueron obtenidos con las secuencias iniciadoras seleccionadas en el presente estudio, para la detección de los genes 16S RNAr y omp2 del género *Brucella*, mostrando estas secuencias iniciadoras ser específicas y sensibles al ser evaluadas frente a muestras de ADN de diferentes géneros bacterianos. La amplificación específica de bandas de 282 bpy de 905 bpen las muestras controles

positivos utilizados en el estudio: *B. abortus* cepas 1119 (C19) y RB51 no obteniéndose amplificados en las muestras de ADN de otros géneros bacterianos como *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., y *E. coli*. El nivel de detección de las secuencias iniciadoras S4-R2 gen 16S RNAr de *Brucella* sp. fue estimado en 500 UFC por reacción de PCR, determinando de este modo la sensibilidad del diagnóstico para esta infección (Figura 1).

FIGURA 1. Especificidad de las secuencias iniciadoras del gen Omp2 y 16S RNAr de *Brucella* sp. Línea: 1 y 6: ADN de *Proteus* spp., Línea: 2 y 7: ADN de *E. coli*, Línea: 3 y 10: ADN de *Pseudomonas* spp., Línea 5 y 9: ADN controles positivos *B. abortus* cepa 19; peso molecular 100 bp ADN ladder.



La amplificación de los genes 16S RNAr y omp2 de *Brucella* sp. en las 31 muestras de ADN de sangre de bovinos con resultados de serología positiva a brucelosis, incluidos en el estudio, sólo fue exitosa en el 16% de los animales evaluados (5/31) evidenciándose amplificados de 282 bp y 905 bp respectivamente; con bandas de intensidades variables en comparación con los amplificados de los controles positivos (cepa 19). De los animales muestreados, la prueba Rosa de Bengala detectó seis animales positivos de los cuales dos coincidieron con la PCR o sea el 40% (2/5), mientras la Seroaglutinación Lenta en Tubo mostró 26 animales positivos incluyendo a los animales positivos a la PCR. En cuanto a la técnica de diagnóstico, 2 Mercapto Etanol,

encontró 16 animales positivos de los cuales sólo cuatro fueron positivos a la PCR.

Esta amplificación ha sido considerada [10] como una técnica de detección específica y sensible, una alternativa para confirmación de aislamientos o como técnica de diagnóstico directo en muestras clínicas. Ella sería un importante apoyo para los programas de prevención, control y erradicación de la brucelosis implementados en el país, en especial en áreas de baja prevalencia, como es el caso del estado Lara, en las cuales las pruebas serológicas de uso rutinario del programa, muestran frecuentes controversias [1] (Figura 2).

En la Tabla II se comparan los resultados del diagnóstico obtenido por PCR con los del diagnóstico serológico a través de las

Detección de *Brucella sp* por PCR en bovinos Pacheco N, Mosquera O.

pruebas ya descritas en los bovinos del estudio. Se puede evidenciar que las pruebas cuantitativas SLT y 2ME presentan sensibilidad de 80 % y 100%, respectivamente; mientras que con la técnica RB se obtuvo la mayor especificidad.

En cuanto a la concordancia de estas técnicas, el índice Kappa mostró una concordancia discreta entre las técnicas indicadas y la prueba de la PCR.

FIGURA 2: Amplificación de los genes Omp2 y 16S RNAr de *Brucella sp.* en muestras de ADN de sangre de bovinos seropositivos a brucelosis. Líneas: 1, 3, 4, 5, 7 y 8: ADN de bovinos, peso molecular 100PP DNA ladder (Promega Corporation), Líneas: 2 y 6: control positivo ADN genómico de *Brucella abortus* cepa 19, Línea: 9: control negativo ADN de *E.coli*.

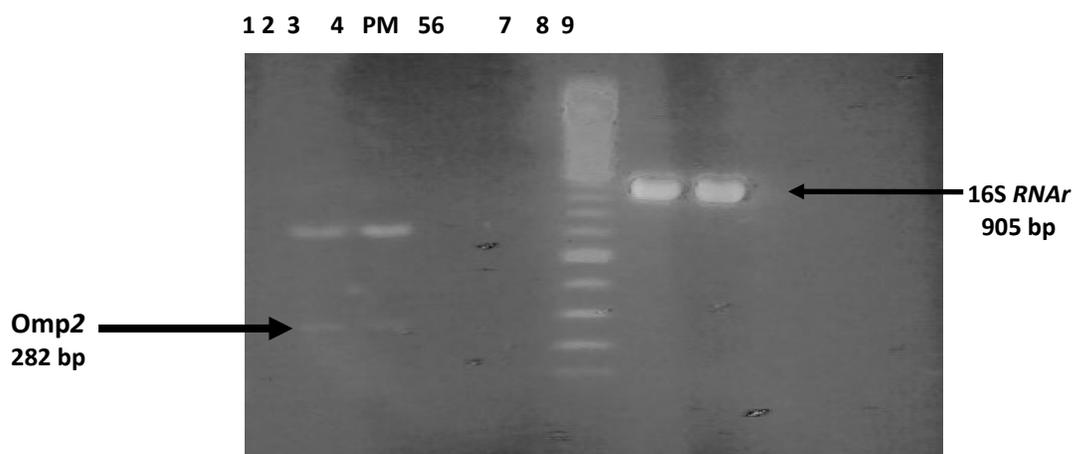


Tabla II: Reportes de positividad a la infección por *Brucella abortus* en los bovinos evaluados en el estudio. RB: Prueba oficial de campo o Prueba Rosa de Bengala, SLT: Prueba de Seroglutinación Lenta en Tubo, 2ME: Prueba 2-Mercaptoetanol, PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

INDICADOR	RB	SLT	2ME
Sensibilidad	33	100	80
Especificidad	88	19	54
Índice Kappa	0,23	0,07	0,18

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, en cuanto a la amplificación por PCR de los genes incluidos en el estudio, fue exitosa en el 16 % (5/31) de las muestras analizadas, considerados los animales verdaderos positivos a la enfermedad. Los diagnósticos obtenidos con estas pruebas serológicas utilizadas, evidencian la desconfianza que tienen tanto los productores como los Médicos Veterinarios de campo, por cuanto la capacidad de precisar animales verdaderamente negativos o especificidad de estas técnicas, es muy baja. Así, la prueba de seroaglutinación lenta en tubo de cada 100 animales positivos apenas detecta 19, mientras que la prueba 2 Mercapto Etanol tiene una especificidad de 54%. La prueba de diagnostico oficial de campo, Rosa de Bengala es la que presenta mejor especificidad (88%), pero la sensibilidad es apenas del 33%, es decir que de 100 positivos sólo detecta 33.

La confiabilidad de los resultados de las pruebas serológicas está en relación directa con la prevalencia de la enfermedad en una región específica, por lo que sus resultados son muy variables, requiriendo pruebas confirmatorias de alta sensibilidad y especificidad como la prueba PCR, para corroborar el diagnóstico. En este estudio los resultados fueron similares a los obtenidos por otros autores [16] en cuanto a la prueba Rosa de Bengala, pero en el caso de Seroaglutinación Lenta en Tubo y 2 Mercapto Etanol, los valores no fueron coincidentes. Otros estudios relacionados con seroaglutinación para el diagnóstico de brucelosis en búfalos [17], muestran resultados distintos tanto en sensibilidad como en especificidad, en este estudio el grado de concordancia encontrado entre las técnicas y PCR mediante el Índice Kappa fue discreta para la técnica Rosa de Bengala, y no fue significativa para las pruebas Seroaglutinación Lenta en Tubo y 2 Mercapto Etanol.

En esta investigación, se evidencia la posibilidad de obtener un diagnóstico

definitivo mediante la PCR a partir de muestras de sangre de animales serológicamente positivos. La baja concordancia obtenida entre esta técnica y las pruebas serológicas oficiales, indican que estas no son apropiadas para realizar estudios epidemiológicos y diagnósticos definitivos de la enfermedad. La inclusión de técnicas especializadas en el diagnóstico oficial de la brucelosis como técnicas indirectas: ELISAI, ELISAc, Fluorescencia polarizada y la PCR, deben ser consideradas por las autoridades sanitarias del país, como reales alternativas para la confirmación del diagnóstico de esta zoonosis

CONCLUSIONES

La utilización del PCR a través de la amplificación de los genes Omp2 y 16S RNAr de *Brucella* sp. como técnica de diagnóstico para esta infección, mostró en el presente estudio ser altamente específico detectando exitosamente la infección en las muestras con mayores títulos de inmunoglobulinas específicas de tipo IgG como la prueba 2 ME; la cual evidencia los casos de brucelosis crónicas en los bovinos afectados.

La baja especificidad de las técnicas serológicas para el diagnóstico de brucelosis bovina se evidencia en el 67% de animales falsos negativos para la prueba oficial RB, que se quedan diseminando la enfermedad en el rebaño y animales que se eliminan de la ganadería nacional con diagnóstico errado en 81% para la prueba seroaglutinación lenta en tubo. Es preocupante la baja sensibilidad obtenida en la prueba oficial RB que apenas pudo detectar el 33% de los animales verdaderamente positivos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del estudio agradecen al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" por el financiamiento otorgado

para la realización de este estudio (Proyecto código: 010-VE-2007).

BIBLIOGRAFÍA

[1] Lord V. Diagnóstico de Brucelosis. X Curso sobre Diagnóstico Serológico de Brucelosis Bovina. Ministerio de Agricultura y Tierras (MAT). Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria (SASA). 2002;79-83, Lara, Venezuela.

[2] Informe Técnico. Diagnostico situacional de Brucelosis bovina Ministerio de Agricultura y Tierras (MAT). Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria (SASA). 1999;1-10, Lara, Venezuela.

[3] Vargas F. Situación epidemiológica de la brucelosis en Venezuela. Gaceta Cs Vet 2003; 8(2):69-78.

[4] Castro H, González S, Prat M. Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquím Clín Latinoam 2005; 39 (2):203-216.

[5] Contreras J. Brucelosis en: Contreras, J. (Editor). Enfermedades de los bovinos. Diagnóstico Tratamiento Control 2000; 2 ed.p 859.

[6] Acha P, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera Edición. Vol. I. Bacteriosis y micosis. Publicación Científica y Técnica No. 580. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Organización Mundial de la Salud (OMS) 2001; 28-56.

[7] Corbel MJ, Stuart FA, Brewer RA. Observations of serological cross-reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. Dev Biol Stand 1984; 56:341-348.

[8] Freer E, Castro R. *Brucella*: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. Rev Costarric Cs Med 2001; 22 (1-2):1-9.

[9] González J. Programa de brucelosis: Situación epidemiológica y estrategias para la prevención y el control/erradicación en Venezuela. Reunión de expertos en brucelosis OPS/OMS 1999, Santiago de Chile.

[10] Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiébaud M, Dubray G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. J Appl Bacteriol 1996; 81(3):267-275.

[11] Aréstegui MB, Gualtieri CS, Domínguez J, Scharovsky GS. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. Vet Mex 2001; 32(2):131-139.

[12] Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goñi I. Specific detection of *brucella* DNA by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33(3):615-617.

[13] Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. J Clin Microbiol. 1996; Feb; 34(2):477-478.

[14] Al-Attas RA, Al-Khalifa M, Al-Qurashi AR, Badawy M, Al-Gualy N. Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. Ann Saudi Med 2000; May-July; 20(3-4):224-228.

[15] Sánchez M, Cardona N. Evaluación de la prueba PCR para la detección de *Brucella abortus*. Rev CES Med Vet y Zoot 2013; 8 (2):61-72

[16] Álvarez M, Saldaña C, Ballesteros M, Morales A. Comparación de las pruebas: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), serología y hemocultivo con respecto a sensibilidad y especificidad, para la detección de *Brucella* sp en muestras humanas. Gac Med Mex 2015; 151:620-627.

[17] Rosales D, Lugo A, Andueza F, López A. Pesquisa serológica y molecular de

Brucella sp en un rebaño bufalino lechero en la cuenca del sur del Lago de Maracaibo. Rev Salud Ani 2015; 37(2):112-117.

[18] Jaramillo C, Martínez J. Consideraciones en el uso de pruebas diagnósticas. Epidemiología Veterinaria. 2 Ed. Manual Moderno. México D.F 2010.

[19] Jalava KR, Jalava J. Método óptimo de aislamiento de ADN para la detección de bacterias en muestras por PCR. J Clin Bacteriol 2002; 40(11):4211-4217.